

**Spitalul Clinic de Boli Infecțioase
"Sf.Parascheva,, Iași
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2**

PROCEDURA SPECIFICA

COPROCULTURA

COD: PSL – M2 – 02

**Editia 2, Revizia 0
Din data de 11.03.2015**

APROBAT
Manager tehnic
Conf.Dr. Olivia Dorneanu

VERIFICAT
Responsabil calitate
.....

Elaborat:
Responsabil analiza
Dr. Rodica Fântânu

**DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.**

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecțioase "Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 2 din 31

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
RC	0.	20.08.2015						
Manager Tehnic	1.	20.08.2015	Conf. Dr. Olivia Dorneanu					
Sef Compartiment Microbiologie 2	2.	20.08.2015	Dr. Rodica Fântânu					
Responsabil analiza	3.	20.08.2015	Dr. Rodica Fântânu					

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 3 din 31

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat
1	20.08. 2015	2		Responsabil analiza-Dr.Rodica Fântânu	Respon- sa bil calitate-	Manager tehnice- Conf.Dr. Olivia Dorneanu

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 4 din 31

0. CUPRINS

CAPITOLUL

- | | |
|-----|---|
| 0 | Scop |
| 1 | Domeniu de aplicare |
| 2 | Principiul si metoda procedurii utilizata |
| 2.1 | Definiții |
| 2.2 | Abrevieri |
| 3 | Caracteristici de performanta |
| 4 | Tipul de esantion |
| 5 | Pregatirea pacientului |
| 6 | Tip de recipient si aditivi |
| 7 | Echipamente si reactivi necesare |
| 8 | Controale de mediu si de securitate |
| 9 | Descrierea activitatii- Etapele procedurale |
| 10 | Comunicare rezultate si valori de referinta |
| 11 | Proceduri de control de calitate |
| 12 | Interpretare clinica de laborator |
| 13 | Surse potentiale de variatie |
| 14 | Referinte |
| 15 | Responsabilitati |
| 16 | Inregistrări |

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 5 din 31

1. SCOP ȘI DOMENIU DE APLICARE

Procedura descrie activitățile și etapele, din Compartimentul de Microbiologie 2 (produse patologice din situasuri normal contaminate) privind prelucrarea MF în scopul stabilirii diagnosticului etiologic în sindromul diareic acut și în TIA.

Procedura se aplică în cadrul Compartimentul de Microbiologie 2 al Laboratorului

2. PRINCIPIUL METODEI

Cultivarea pe medii de cultura adecvate a bacteriilor patogene existente in intestinul omului, cu identificarea caracterelor lor biochimice si antigenice, urmata de determinarea sensibilitatii lor la antibiotice. Este indicata in:

- infectii cu localizare primara enterala si invazie ulterioara(aspect septicemic)
- infectii cu localizare exclusiv enterala sub forma clinica de enterocolite, boala diareica, toxiinfectii alimentare evoluind sub forma acuta,subacuta sau cronica, clinic inaparenta sau simpu portaj
- schimbarea structurii florei bacteriene specifice intestinului care poate aparea in unele situatii patologice(colita pseudomembranoasa) sau ca o consecinta a selectiei unor germeniconsecutiv antibioterapiei

2.1 DEFINIȚII ȘI ABREVIERI

2.1.1 Coprocultură: examen microbiologic al materiilor fecale

2.1.2 Antibiotograma: test de laborator care evidențiază rezistența sau sensibilitatea unui germen patogen (bacterie) la diferite antibiotice.

2.1.3 Izolare bacteriană: cultivarea bacteriilor pe medii de cultură agarizate prin epuizarea inoculului cu ansa

2.1.4 Primocultură: izolarea bacteriilor din prelevatele patologice

2.1.5 Cultură pură: cultură formată din descendenții unei singure colonii rezultate după o epuizare a materialului microbian, care duce la creștere sub forma coloniilor bine izolate pe medii agarizate

2.1.6 Medii de cultură selective: conțin substanțe care inhibă dezvoltarea bacteriilor de contaminare a prelevatelor; pentru izolarea enterobacteriaceelor din prelevate contaminate există medii cu trei niveluri de selectivitate: slab selective care inhibă bacteriile Gram pozitive , moderat selective care inhibă pe lângă bacteriile Gram pozitive și o parte din bacilii Gram negativi comensali și înalt selective care inhibă o gamă mai largă de bacterii comensale

2.1.7 Medii de îmbogățire: medii de cultură lichide care prin anumite substanțe inhibitoare, prelungesc faza de lag a bacteriilor de contaminare, fără a întârzia însă intrarea unor patogeni în faza exponențială.

2.1.8 Medii diferențiale: conțin substratul pentru o anumită enzimă bacteriană și un indicator care atestă atacarea acestui substrat

2.1.9 Teste biochimice de identificare: teste care se efectuează pe medii speciale de identificare ce conțin anumiți indicatori și un substrat , care permit recunoașterea unei bacterii pe baza activității sale biochimice și identificarea preliminară a acesteia

2.1.10 Teste serologice (antigenice) de identificare: teste care se efectuează prin reacții de aglutinare pe lamă sau latex aglutinare ce permit identificarea cu certitudine a unei specii bacteriene

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 6 din 31

2.2 Abrevieri:

UFC: Unități formatoare de colonii
 ATCC: American Type Culture Collection
 TSI: Triple Sugar Iron (glucoză, zaharoză, lactoză) – mediu de identificare multitest
 ADCL: Agar deoxicolat citrat lactoză – mediu moderat selectiv de izolare a Enterobacteriaceelor
 MC: Agar Mc Conkey – mediu slab selectiv de izolare a Enterobacteriaceelor
 MC-sorb: Agar Mc Conkey cu sorbitol – mediu diferențial pentru EHEC
 AABTL: Agar albastru bromtimol lactoză – mediu diferențial
 WB: Mediul Wilson- Blair – mediu înalt selectiv izolare Salmonella typhi
 CIN-Ye: Mediu selectiv de izolare Yersinia
 TCBS : Mediu Taurocolat citrat bilă sucroză – mediu înalt selectiv de izolare Vibrio
 BSA: Mediu Bilă sare agar – mediu moderat selectiv de izolare Vibrio
 AP: Apă peptonată
 AP-alc: Apă peptonată alcalină - mediu de îmbogățire Vibrio
 MK: Mediu Karmali – mediu selectiv Campylobacter
 AS: Mediu Agar sânge – mediu nutritiv
 TIA: Toxiinfecție alimentară
 EPEC: Enteropatogen Escherichia coli
 EHEC: Enterohemoragic Escherichia coli
 LA: Latex aglutinare
 SF: Ser fiziologic
 AD: Apă distilată
 MF: Materii fecale
 BDA: Boală diareică acută
 UV: Ultraviolete

3. CARACTERISTICI DE PERFORMANTA

Procedura se executa in conformitate cu documentele de referinta, utilizand medii de cultura performante, adecvate izolarii si identificarii bacteriilor patogene, inalt patogene si conditionat patogene, respectand conditiile de incubare pentru speciile bacteriene aerobe, anaerobe si microaerofile iar identificarea caracterelor antigenice se realizeaza cu reactivi provenid de la producatori recunoscuti pe plan mondial. Tulpinile bacteriene izolate si identificate, au fost confirmate de laboratorul de referinta al Institutului „I. Cantacuzino”-Bucuresti.

4. TIPUL DE ESANTION

Materiile fecale

Probele de MF sunt recoltate și transportate la Laborator conform Manualului de recoltare a produselor biologice MRP-01 în intervalul orar 8⁰⁰-12⁰⁰; probele de MF prelevate în afara programului normal de lucru sunt depozitate în frigiderul de gardă (4-8°C), sunt recepționate, înregistrate și procesate a doua zi dimineața.

Modul de recepționare, înregistrare și transport al produselor biologice în Laborator se desfășoară în conformitate cu MRP-01.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 7 din 31

Criteriile pentru respingerea probei biologice sunt:

- recipient inadecvat
- lipsa mediului de transport
- cantitate insuficientă de produs biologic
- cantitate prea mare de produs biologic depasind nivelul de mediu de transport
- lipsa datelor de identificare de pe recipient
- lipsa formularului de solicitare

5. PREGATIREA PACIENTULUI

Instruirea pacientului cooperant privind autorecoltarea materiilor fecale, ca si recoltarea acestora de la sugari, copii mici si pacienti necooperanti , etichetarea probelor si inregistrarea in Registrele de evidenta recolte de la nivel pavilionar, este descrisa in MRP-01

6.TIPUL DE RECIPIENT SI ADITIVI

Tipul de recipient este coprorecoltorul cu lingurita colectoare si capac insurubat cotinand mediu de transport Cary-Blair, care mentine viabilitate trofozoitilor, larvelor de paraziti, a bacteriilor patogene si inalt patogene ca si a virusurilor. Este prezentat in MRP-01.

7. ECHIPAMENTE, REACTIVI NECESARE SI RESURSE UMANE

a. Echipamente și materiale de laborator

- autoclav
- termostat la 37°C și 42°C
- etuvă
- microscop optic
- hotă cu flux laminar
- frigider(vitrină frigorifică)
- balanță de precizie
- lampă cu UV
- pH-metru
- bec de gaz Bunsen
- scală nefelometrică McFarland
- lupă
- lame de microscop portobiect și lamele
- cristalizor
- anse și fir de însămânțare
- coprocultoare cu linguriță colectoare și capac înfiletat
- cutii Petri
- hârtie de filtru
- eprubete 10/10 și 12/12
- pense
- sticlute de 8ml
- pipete automate
- vârfuri pipete automate
- psipete/pipete Pasteur
- stativ eprubete

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 8 din 31

- jar de 2,5 l pentru incubare în condiții speciale
- containere pentru colectarea materialelor contaminate incinerabile
- soluții dezinfectante (soluție clorinată și amestec sulfocromic)
- recipiente pentru soluții dezinfectante
- medii de cultură
- seruri de aglutinare pe lamă
- truse latex aglutinare
- truse pentru colorația Gram și Ziehl Neelsen cu safranină
- soluție Lugol
- coloranți: albastru metilen și verde malachit
- plicuri pentru incubare microaerofilă (Cappygen) și pentru anaerobioză
- reactivi adiționali (reactiv Covaci și reactiv Clorură ferică)
- discuri (benzi/ soluție) pentru reacția oxidazei
- perhidrol
- discuri pentru antibiogramă
- ser fiziologic
- ulei de cedru
- ulei de parafină
- parafină solidă

b. Materiale de referință

- tulpini de referință ATCC
- Salmonella enterica ATCC 51812 TM
- Shigella flexner ATCC 12022 TM
- Yersinia enterocolitica ATCC 9610
- Campylobacter jejuni ATCC 33291
- E. Coli O157 H7 nontoxigenic strain NCTC 12900C 1967 I

c. Resurse umane

- un medic
- doi asistenți de laborator
- registrator medical

8. CONTROALE DE MEDIU SI DE SECURITATE

Măsurile de protecție a personalului:

toate produsele biologice trebuie considerate potențial infecțioase și sunt recoltate și manipulate conform regulilor de bioprotecție.

Spatiul compartimentului Microbiologie 2 este amenajat corespunzător și dotat cu :

- Hota bacteriologica
- Termostat la 37°, 42° și 30° C
- Vitrina frigorifica pentru medii de cultura
- Congelator

Accesul în spațiul de lucru este controlat

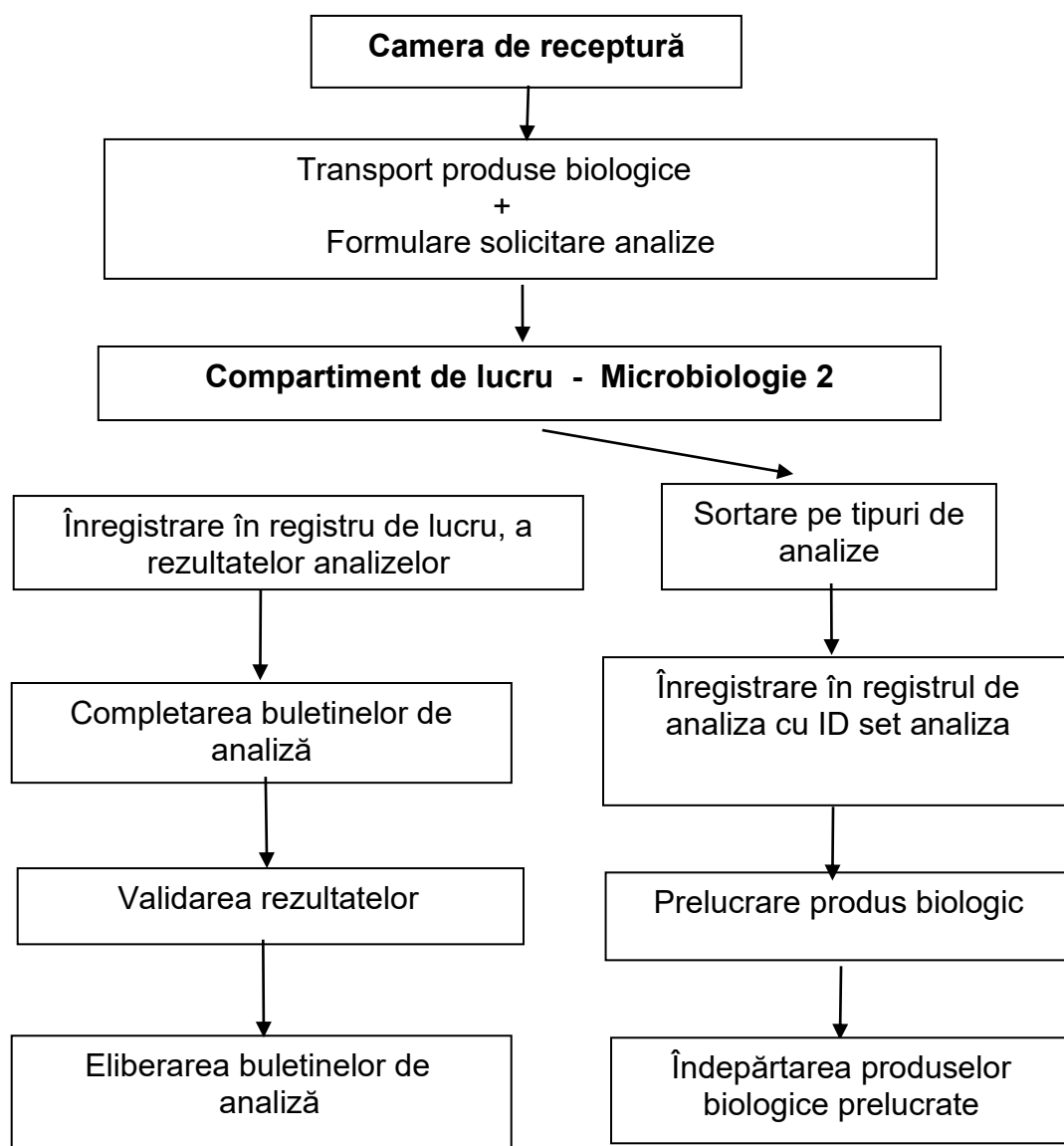
Monitorizarea condițiilor de lucru și a curăteniei se execută în conformitate cu PGL-5.2- Condiții de mediu și de lucru, a POL-01-Norme de curătenie și a POL-02- Biosiguranță.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 9 din 31

9. DESCRIEREA ACTIVITATII - ETAPELE PROCEDURALE

Activitatea din cursul dimineții începe prin examinarea culturilor bacteriene dezvoltate în ultimele 24-48 ore, repicarea coloniilor suspecte pe medii de identificare, interpretarea caracterelor biochimice și identificarea caracterelor antigenice prin aglutinări pe lamă sau latexaglutinare a tulpinilor identificate, examinarea și interpretarea antibiogramelor efectuate, toate datele fiind consemnate în registrul de analiza. Elaborarea diagnosticului de laborator cu consemnarea acestuia în registrul de analiza si pe formularul de solicitare, este urmata de introducerea lui in SIUI, validarea si eliberarea Buletinului de analiza.

După recepționarea și transportul produselor biologice la compartimentul de lucru, activitatea se desfășoară conform schemei I:



Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași	PROCEDURA SPECIFICA	Ediția 2
Laboratorul de analize medicale	COPROCULTURA	Revizia 0
	Cod: PSL – M2-02	Exemplar nr.
		Pag, 10 din 31

Operațiuni pregătitoare

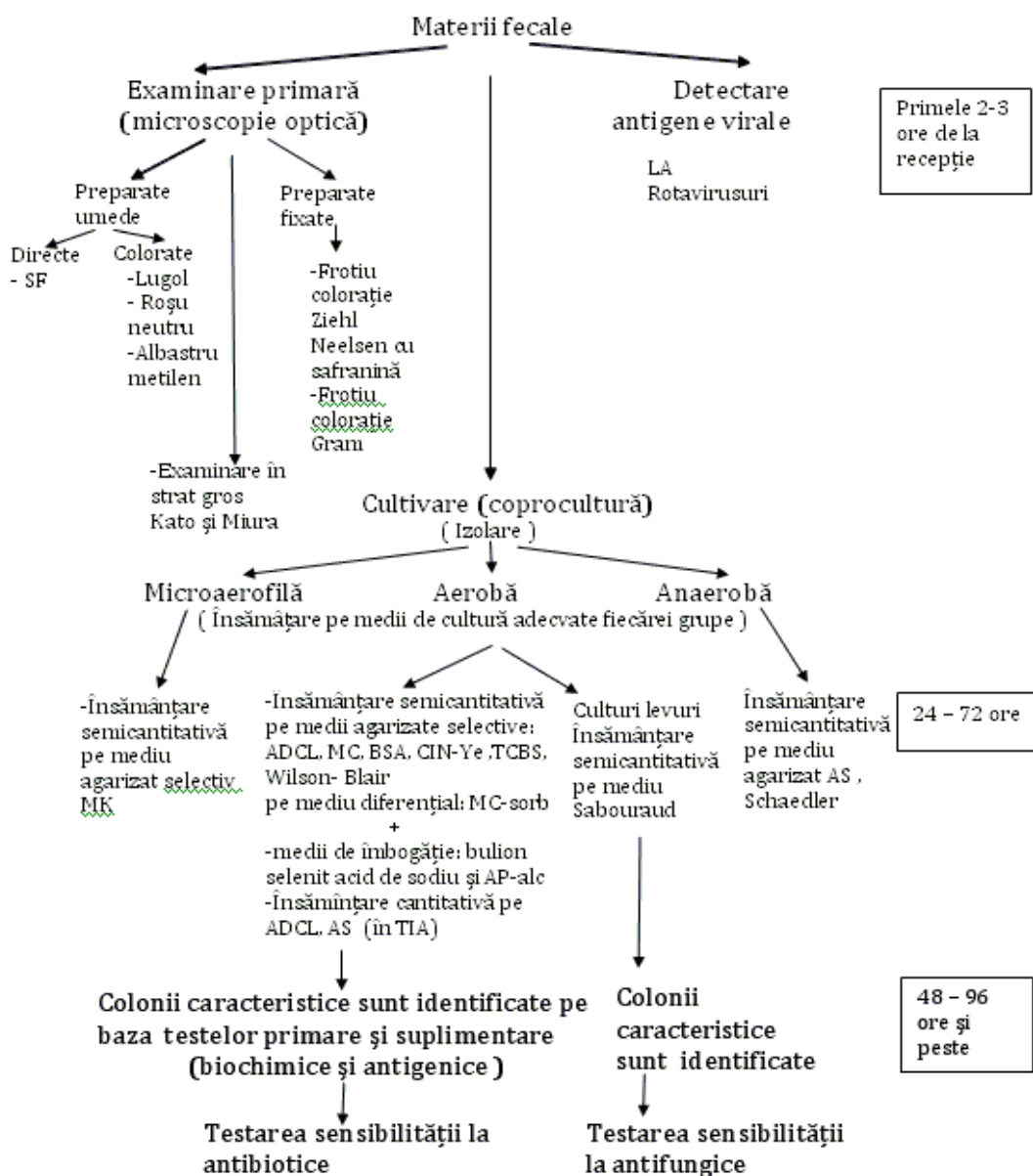
Mediile de cultură, coloranții sunt preparați conform instrucțiunilor de preparare, de către asistentul de laborator, în camera de preparare , sunt turnate în plăci Petri și recipiente, în boxa de turnare medii , apoi sunt depozitate în vitrine frigorifice.

Sticlăria reciclabilă (eprubete, sticlute, flacoane etc.) este pregătită pentru utilizare de către asistentul de laborator.

Materialele (plăci și flacoane cu medii de cultură preparate) cât și sticlăria (eprubete, sticlute) sterilizate și pregătite pentru utilizare, sunt aduse într-o cantitate estimată pentru 2-3 zile, de către asistentul de laborator ce deservește compartimentul de lucru , fiind depozitate în frigider (mediile de cultură) fie în cutii cu capac (eprubete, sticlute, lame etc.).

Zilnic un număr estimat de plăci cu medii se pun la uscat în termostat înainte de utilizare și se repartizează câte 2-3 ml mediu de îmbogățire bulion selenit acid de sodiu, într-un număr estimat

Etapele analizei microbiologice se desfășoară conform schemei :



de sticlute

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 11 din 31

:

Etapele examenului microbiologic sunt

Etapa I în primele 24 ore:

- Examenul microscopic al MF
- Însămânțarea MF pe medii de cultură agarizate și medii de cultură lichide de îmbogățire, adecvate categoriei bacteriene, urmată de incubare 15-24 ore;
- Examenul virusologic al MF;

Etapa II după 15-24 ore

- Examinarea culturilor dezvoltate și repicarea coloniilor suspecte pe bateria minimală de teste biochimice (TSI, mediul cu manită și un sector de mediu diferențial AABTL/Drigalski) urmată de incubare 15-24 ore;
- Efectuarea testelor primare -examinarea microscopică a unora din culturile bacteriene (frotiu colorat Gram), testul catalazei ,oxidazei și coagulazei pentru alte culturi bacteriene;
- Reexaminarea primoculturilor, la 48 ore și eventuale repicări a coloniilor suspecte dezvoltate tardiv;

Etapa III după 42-72 de ore

- Efectuarea testelor de identificare antigenică (aglutinare pe lamă, latex aglutinări);
- Repicarea coloniilor suspecte pe baterie lărgită de teste biochimice (apă peptonată pentru reacția indolului, mediu cu lizină și martor lizină, mediul cu fenilalanină, mediul Simons cu citrat, pe lângă TSI, mediul cu manită și un sector de mediu diferențial AABTL/Drigalski, iar pentru alte culturi bacteriene mediul agar cu esculină și sector de AS) dacă bateria minimală nu a fost concludentă, și se purifică culturile mixte;
- Efectuarea antibiogramei sau antifungigramei urmată de incubare 24 ore;
- Reexaminarea primoculturilor bacteriene la 72 ore și eventuale repicări a coloniilor suspecte dezvoltate tardiv;
- Comunicarea rezultatelor examinării microbiologice a MF, prin întocmirea și tipărirea buletinul de analiză, cod FGL – 5.8-01.

Etapa IV după 72-96 ore și uneori mai mult

- Comunicarea antibiogramei sau antifungigramei;
- Stocarea culturilor bacteriene patogene și înalt patogene în eprubete cu agar de stocaj urmată de incubarea lor 24 ore și parafinarea eprubetelor.

PROCEDURA DE LUCRU

Examenul microscopic precede executare culturilor bacteriene.

EXAMENUL MICROSCOPIC:

- Include examinarea de preparate umede și/sau fixate, având ca scop vizualizarea citologiei respectiv prezența sau absența recției inflamatorii cu sau fără prezența hematiilor cât și a elementelor parazitare (trofozoți, chiști, ouă și larve), a dominanței fungilor și prezența în exces a unor produși de digestie (amidon, fibre musculare , mucus etc.)
- Permite identificarea produsului patologic prin depistarea resturilor alimentare nedigerate, si a elementelor de origine intestinala.
- Permite orientarea diagnosticului spre alte posibile etiologii ale BDA, decat cea bacteriana sau

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 12 din 31

existenta unei etiologii mixte.

Elementele componente pe care le putem gasi:

- resturi alimentare nedigerate sau partial digerate`
- elemente de origine intestinala
- elemente de origine parazitara
- bacterii si levuri

A. Resturi alimentare:

- Fibre musculare striate apar ca urmare a ingerarii carni

cele digerate au aspectul unor fragmente ovale mai mari sau mai mici, cu capete rotunjite si fara striatiuni, de culoare galbena sau galben aurie din cauza bilei; cand sunt mai palide –transparente, poate denota o retentie de bila

cele partial digerate sau nedigerate au o culoare galben- inchisa si sunt de obicei mai lungi, au capetele drepte si striatii intacte, pastrandu-se atat desenul longitudinal cat si cel transversal; aparitia lor in numar mare, semnifica o insuficienta pancreatica asociata sau nu hiposecretie de acid clorhidric sau un tranzit intestinal accelerat

- Grasimile se pot prezenta cel mai frecvent sub forma grasimilor neutre, care in cantitate mica se pot intalni si in mod normal; se prezinta sub forma de picaturi clare, usor galbui din cauza bilei , cu diametrul variabil.Prezenta unei cantitati mari de grasimi neutre, atrage atentia asupra unui proces de maldigestie de obicei printr-o insuficienta pancreato-biliara.

- Amidonul cu solutia Lugol, se coloreaza in albastru-violet inchis daca este nedigerat si in nuante mai deschise sau chiar in rosu , daca este digerat.

Amidonul inclus este cel organizat din interiorul celulelor (cartofi/leguminoase),se coloreaza in albastru si este inconjurat de o membrana.

Amidonul amorf este cel care a pierdut forma sa organizata si se prezinta sub forma de pete sau trasee albastrii.

Amidonul crud se intalneste mai rar si se prezinta ca gramajoare organizate in straturi concentrice, colorate aproape in negru.

Eritrodextrina, rezultata din digestia amidonului, se coloreaza in rosu. In cazul unor preparate bogate in amidon, in coloratia cu solutia Lugol, acestea iau in intregime culoarea inchisa, vizibila cu ochiul liber. Prezenta sa in cantitate mare, este consecinta unui tranzit intestinal mai accelerat.

- Celuloza nedigestibila rezultata din alimentele vegetale, se prezinta sub forma de vase vegetale, peri vegetali, spori, graunte de polen, membrane in placarde mai mari sau mai mici, etc. Nu are o semnificatie semiologica.

- Cristale de origine alimentara, in special cristalele de oxalat de calciu intra sau extracelular, in cantitate mare pledeaza pentru o insuficienta gastrica.

B. Elemente de origine intestinala:

- Mucusul se prezinta sub forma unor flocoane transparente ce contin adesea globule rosii, globule albe, celule epiteliale, microbi.In afectiunile inflamatorii se intalneste o cantitate mai mare de mucus.

- Celule epiteliale cilindrice libere sau inclavate in mucus, denota un proces inflamator al peretelui intestinal, atunci cand sunt abundente; uneori se pot intalni si celule pavimentoase detasate odata cu eliminarea scaunului prin canalul anorectal.

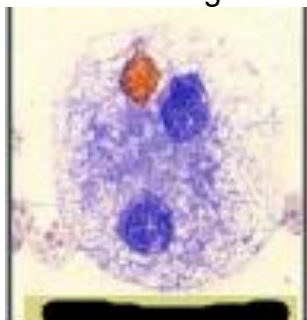
- Hematiile intacte denota o hemoragie inferioara (rectala) sau una superioara dar cu un tranzit foarte accelerat; hematiile din hemoragiile digestive superioare nu pot fi recunoscute, fiind distruse.

- Leucocitele, izolate si in numar mic nu sunt semnificative; un numar mare de leucocite trebuie mentionat semnificand un proces inflamator sau ulcerativ care intereseaza

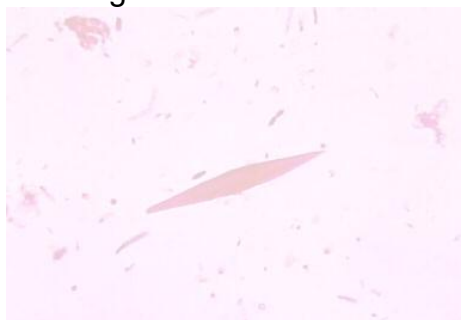
Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 13 din 31

segmentul terminal al tubului digestiv; ele abunda in procesele rectale neoplazice sau bacilare, in rectocolita ulcerohemoragica si in diferite boli infectioase cu localizare intestinala, in unele cazuri de dizenterie amebiana sau rectite parazitare, domina eozinofilele.

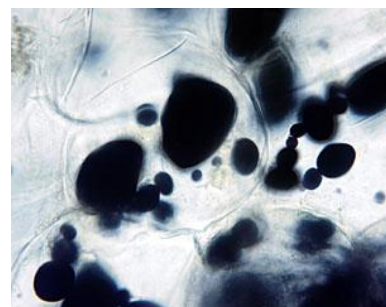
- Cristale de origine endogena: cristale Charcot-Leyden, au diferite marimi, incolore, se gasesc mai frecvent in diferite parazitoze intestinale. Cristale de hematoxina, de culoare rosie-galbuie sau bruna, romboidale, prismatice, etc. apar dupa diferite hemoragii digestive sau dupa o alimentatie bogata in alimente cu sange.



Cristal de hematoxina



Cristale Charcot-Leyden



Amidon nedigerat



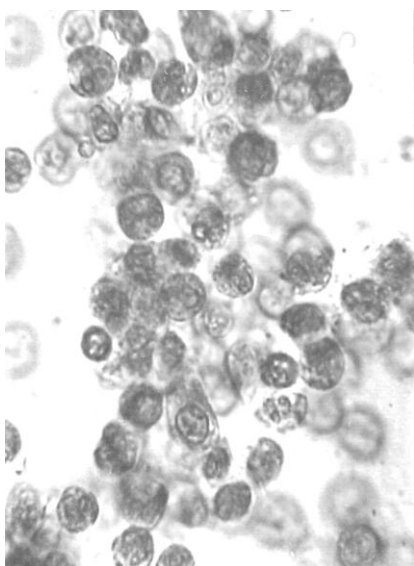
Cristal de acid uric



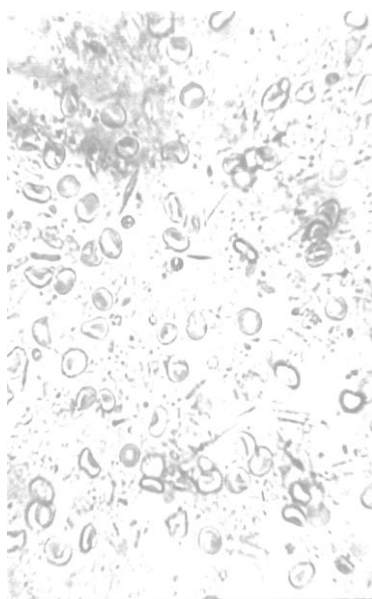
Lambou cilindric de mucus



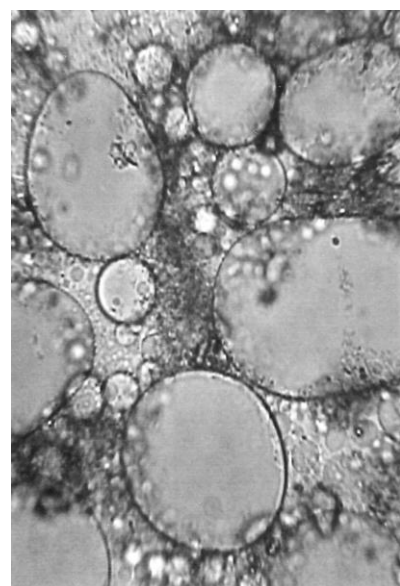
Par vegetal



Reactie inflamatorie – Leucocite



Hematii intacte

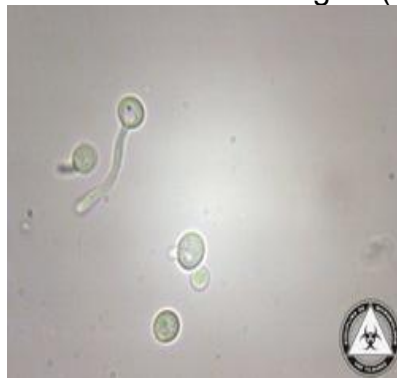


Bule de mucus

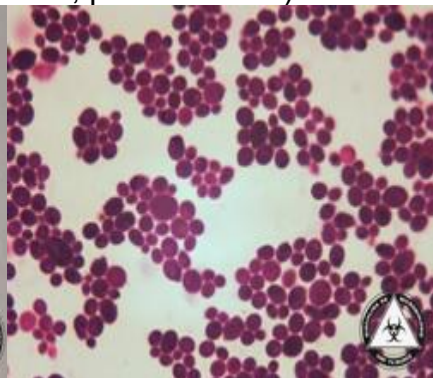
C. Elemente de origine parazitara si metodologia lor de identificare , a fost descrisa in PSL-M2-01

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 14 din 31

D.:Bacterii si levuri: pe preparate necolorate se observa abundenta florei microbiene, eventuala mobilitate a lor, asociata sau nu cu leucocite si hematii ca si prezenta si abundenta unor elemente micologice (levuri, pseudomicelii).



Blastospori cu filamente



Blastospori Gram pozitivi



Granule de polen

COPROCULTURA

Coprocultura urmărește izolarea și identificarea bacteriilor patogene și înalt patogene pe baza caracteristicilor: morfologice , de cultivabilitate, exoenzimatică și antigenice , implicate în BDA și TIA

- Însămânțarea se face din proba ca atare recoltată în coprocultor cu mediu de transport Cary Blair, vizând porțiunile lichide și îndeosebi cele mucoase și/sau sangvinolente; volumul recoltei trebuie să fie minimum 3-5 mg;
- Mediile de cultură utilizate pentru izolare și identificare bacteriană, cât și condițiile de incubare sunt specifice ficărei categorii bacteriene;
- Inocularea mediilor de cultură se realizează cu ansa, din MF omogenizate în mediul de transport, iar dispersarea inoculului se realizează în 3 grupe de striuri parțial suprapuse, fără flambarea ansei între grupele de striuri; din mediile de îmbogățire, după o agitare prealabilă a eprubetelor, se procedează la fel; pentru *Campylobacter* spp., materia fecala se omogenizeaza in prealabil cu Apa peptonata (~5 ml Apa peptonata in eprubeta de 10/100 mm, in care se omogenizeaza materie fecala) si se mentine la temperatura camerei 15-20 minute, in pozitie verticala; dupa sedimentare, se preleva cu o ansa cu bucla mare, din mijlocul coloanei de lichid, si de insamanteaza cu dispersie pe mediul Karmali.
- Repicarea coloniilor suspecte se realizează cu firul de însămânțare, care va fi încălzit la roșu, la începutul și sfârșitul fiecărei repicări;
- Specia bacteriană urmărită (uzual *Shigella*, *Salmonella*) este indicată de medicul specialist pe formularul de solicitare analize F-PGL-5.4-1 I Materii fecale; în afara solicitării medicale se urmăresc și alte specii bacteriene , dacă examenul citologic evidențiază prezența mai ales în număr mare a leucocitelor ± hematiilor (EPEC la nou-născut și copilul mic, EHEC O:157 H:7, *Campylobacter* spp patogene), iar dacă proba de materii fecale este lichidă ca apa de orez se urmăresc în sezonul cald și *Vibrio cholerae* / *parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila* / *sobria* , *Plesiomonas shigelloides* etc. efectuându-se însămânțări pe medii de cultură adecvate;

Caracteristici morfologice si de cultivabilitate

Pentru speciile *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* si *Yersinia enterocolitica*, produsul

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 15 din 31

patologic se insamanteaza pe mediile ADCL, MC-sorb, CIN-Ye si Bulion selenit acid de sodiu. Dupa incubare aeroba la 37°C timp de 16-24 de ore, se examineaza culturile dezvoltate.

Se observă de cele mai multe ori o varietate de colonii , morfologic deosebite, aparținând unor specii bacteriene diferite. In cazul in care nu se obtin colonii izolate, pentru a obține culturi pure, se repică si se dispersează pe sectoare de mediu ADCL, pentru a obține subculturi pure. Dacă sunt colonii izolate suspecte, se pot însămânța mediile de cultură pentru identificarea caracterelor biochimice.



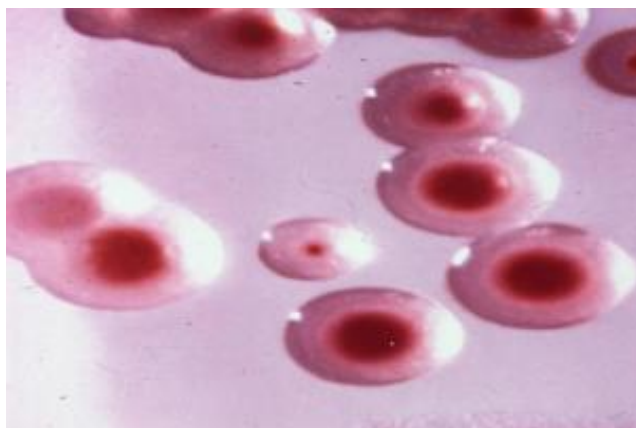
Escherichia coli



Salmonella
Mediu ADCL

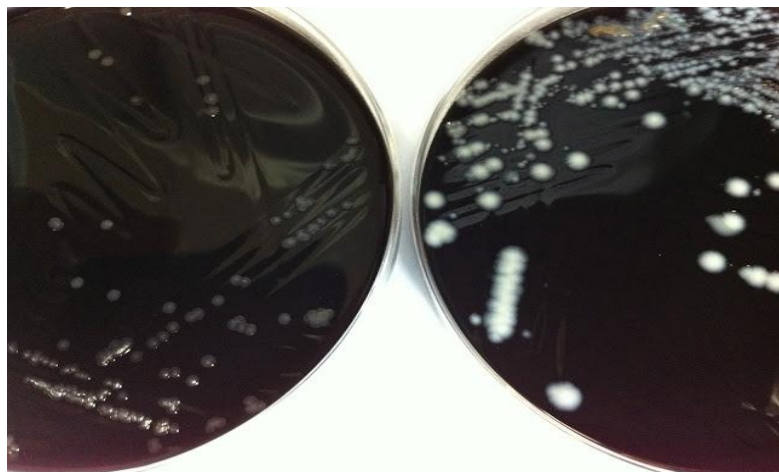


Shigella

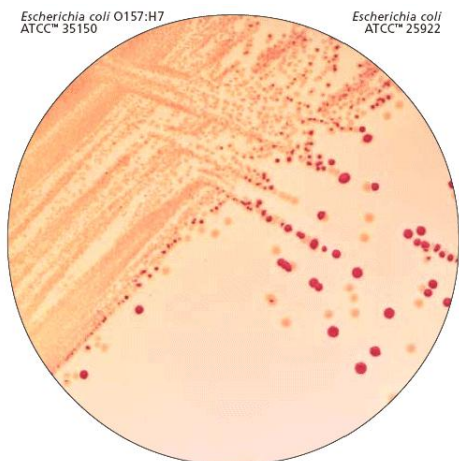


Yersinia enterocolitica (pe mediul CYN Ye)

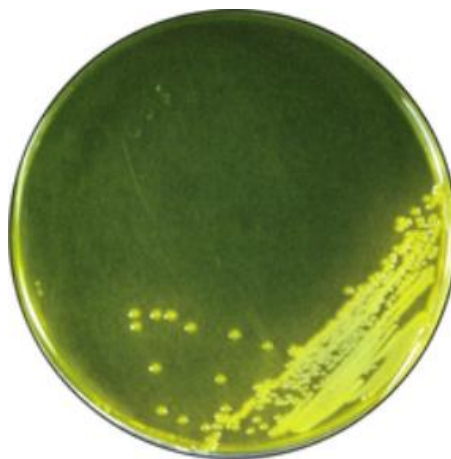
Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 16 din 31



Mediu Karmali:
Campylobacter spp. in stanga
Coliform in dreapta



Mediu Mc-sorb
EHEC –colonii translucide



Vibrio cholerae - TCBS agar



Vibrio parahaemolyticus- TCBS agar



Bacillus cereus - AS

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 17 din 31

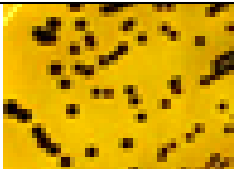


Bacillus cereus - AS

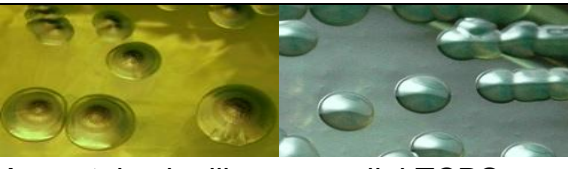


Bacillus anthracis- AS

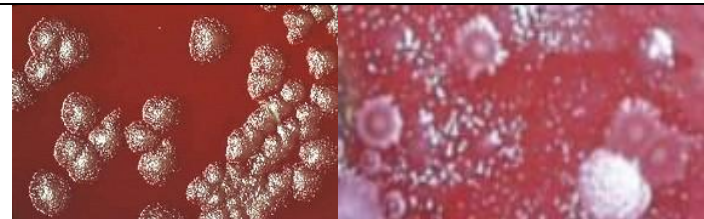
Aspectul coloniilor:

Specia	Aspectul coloniei pe mediul ADCL
<i>Salmonella</i> spp.	 Colonii de 1,5-2 mm, translucide cu central negru, lactoză negative, raportul dintre centrul negru și periferia translucidă, este în favoarea părții translucide
<i>Salmonella typhi</i>	 Colonii de 1-2 mm lactoză negative, cu un mic centru negru, care la unele colonii este foarte mic, sau apare mai târziu
<i>Shigella</i> spp.	 Colonii de 2,5-2,5 mm translucide, bombate sau mai aplatizate, lactoză negative

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 18 din 31

<i>Yersinia enterocolitica</i>	 Colonii 1-1,5 mm translucide, convexe, lactoză negative, care uneori se dezvoltă după 3-5 zile de incubare la temperatura camerei
<i>Escherichia coli</i>	 Colonii roșii sau roz intens, mai mult sau mai puțin opace de 2-3 mm, lactoză pozitive, mai puțin bombate
<i>Proteus spp.</i>	 Colonii mari de 2-3 mm, lactoză pozitive, bombate , cu centrul negru, raportul centrul negru și partea roșie, este în favoarea centrului, cu miros de ouă clocite, datorită hidrogenului sulfurat.
<i>Klebsiella spp.</i>	 Colonii mari 2-4 mm cu tendință de confluaire, bombate, convexe, culoare roz intens, în general lactoză pozitive
<i>Yersinia enterocolitica</i>	 Pe mediul CINYe, coloniile sunt de 1-2 mm, translucide cu centrul roșu
<i>Campylobacter jejuni</i>	 Colonii cenușiu-închis cu tenta maronie și tendința de a se întinde pe striul de însămânțare- mediul Karmali
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	 Aspectul coloniilor pe mediul TCBS

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 19 din 31

<i>Aeromonas hydrophila</i>	 Aspectul coloniilor pe mediul TCBS
<i>Vibrio cholerae</i>	 Aspectul coloniilor pe mediul TCBS
<i>Bacillus cereus</i>	 Colonii hemolitice, cu margini neregulate, La prelevarea coloniei cu ansa, aceasta se desprinde aidoma albusului de ou nebatut
<i>Bacillus anthracis</i>	  Coloniiile sunt non-hemolitice, plate sau ușor convexe, cu margini neregulate si aspectul sticlă mată. Există de multe ori proiecții de la marginea coloniei care dau aspectul de " cap de meduza- " La prelevarea coloniei cu ansa, aceasta se desprinde aidoma albusului de ou batut

Incubarea pentru *Campylobacter* spp, se realizeaza la 40-42°C, in jar cu plic Campygen (care creiaza atmosfera de incubare propice cu azot), iar durata incubarii se prelungeste 48-72 de ore. Pentru *Yersinia enterocolitica*, incubarea la 37°C, a mediului ADCL, se prelungeste 2-3 zile la temperatura camerei- coloniile suspecte dezvoltate in aceste conditii se identifica pe baza caracteristicilor biochimice si antigenice.

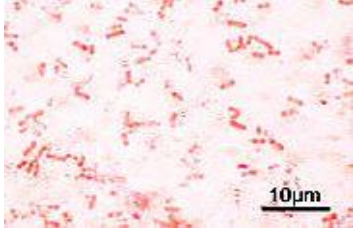
Pentru *Vibrio*, *Aeromonade* patogene si *Plesiomonas shigelloides*, insamantarea initiala se face pe mediul de imbogatire Apa peptonata alcalina si dupa incubare aeroba, se insamanteaza pe mediul BSA si TCBS; examinarea coloniilor dupa 24 h de incubare aeroba, cu efectuarea testelor primare (testul catalazei si testul oxidazei), orienteaza diagnosticul.

Pentru *Clostridium*, insamantarea se face pe mediu special, incubarea in conditii de anaerobioza, in jar.

Examinarea microscopica a culturilor, este necesara pentru unele specii bacteriene: *Campylobacter* spp. si *Vibrio* / *Aeromonade*.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iasi Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 20 din 31

Caracteristici microscopice comparative

Specia bacteriana	Aspect microscop coloratie Gram
Shigella spp.	 BGN
Salmonella spp.	 BGN
Campylobacter spp.	 BGN spiralati
Clostridium difficile	 BGP sporulati
Clostridium botulinum	 BGP sporulati
Vibrio cholerae	
Bacillus cereus	 BGP

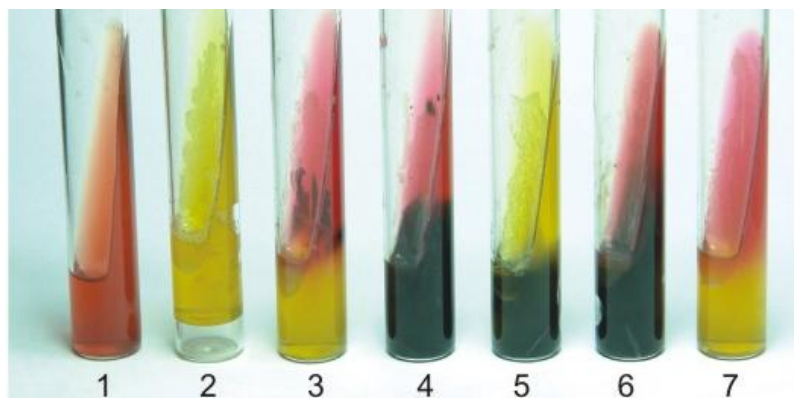
Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 21 din 31

Bacillus antracis	 BGP sporulati
-------------------	---

Identificarea caracterelor exoenzimaticice

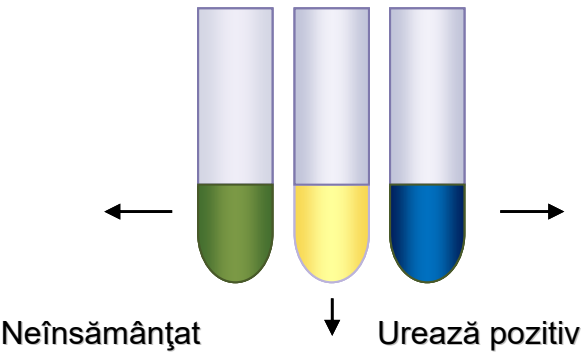
Colonii suspecte se repică pe medii de identificare a caracterelor biochimice. În general se execută 2-3 repicări din colonii diferite, dar asemănătoare morfologic. Repicarea se execută uzual pe mediul TSI si mediul agar cu manită și uree, (pe care se urmărește mobilitatea, fermentarea manitei și producerea de urează) și un sector de mediu AABTL(mediu diferențial pe care bacteriile lactoză pozitive produc virajul mediului în galben , iar cele lactoză negative, lasă mediul nemodificat.

Mediul TSI



1 Neînsămânțat 2 *E. coli* 3 *Salmonella typhi* 4 *Proteus spp.* 5 *Citrobacter freundii* 6 *Salmonella typhimurium* 7 *Shigella flexneri*

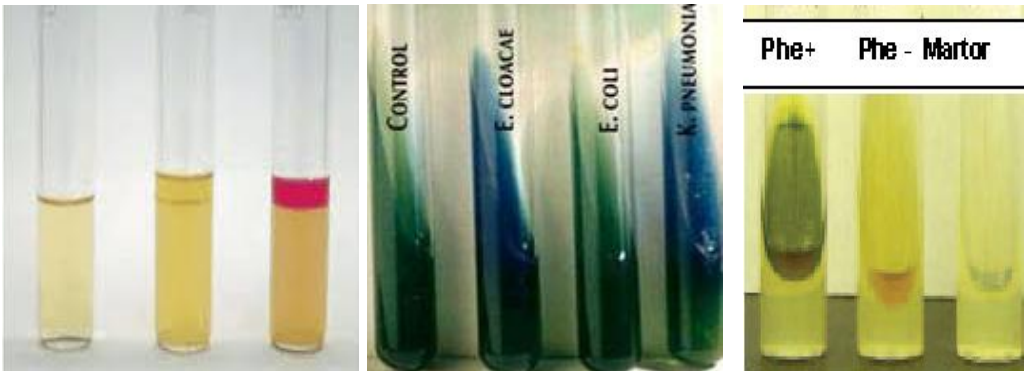
Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Ediția 2 Revizia 0 Exemplar nr. Pag, 22 din 31
---	--	---



Fermentarea manitei

Mediu cu manita

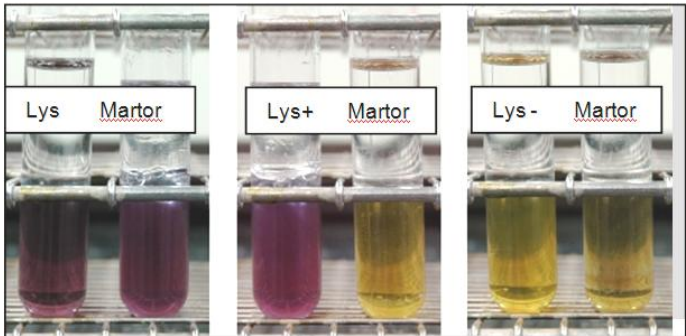
Pentru cazurile neconcludente, se lărgeste bateria de teste pentru a obține noi criterii de identificare.



Reacția indolului

Utilizarea citratului ca unică
sursă de carbon

Dezaminarea Phe



Decarboxilarea lizinei

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 23 din 31

Caracterele exoenzimaticice:

Specia	Mobi- litate	Glu- coza	Lac- toza	Zaha- roza	Hidro- gen sulfurat	Gaz din glucoză	Indol	Li- zină	Ci- trat	Phe	Urea za	Manitol	Oxidaz a
<i>Salmonella</i> spp.	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	+	-	-	-	+/-	+/-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- excepție varianta manita negativa	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	+	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	+	-	-	-	-	d	-	-	-	-	+	-
<i>E. coli</i>	+ excepție E.coli inactiv	+	+	V	-	+	+	d	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	- 37° + 25°	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Campylobacter</i> spp.	+	-	-	-	-/+	-					-	-	+
<i>Vibrio</i> spp.	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>Aeromonas</i> spp.	+	+	+/-	+/-	-	+/-	+	+/-	-	-	-	+/-	+
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	+ (slab)	+	+/-	+/-	-	-	+	+	-	-	-	-	+ aglutina re + cu ser anti Shigella sonnei

Identificarea caracterelor antigenice

Identificarea caracterelor antigenice se realizează cu seruri pentru aglutinarea pe lamă.

Pentru *Salmonella* spp. se utilizează:

- Seruri polivalente care conțin aglutinine pentru:

grupele ABDEL (conține aglutininele 1,2,12 +4,5,12 +9,12 9,46 +

3,10 +3,15 +1,3,19)

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 24 din 31

și separat pentru
grupele CFGH (conține aglutinine 6,7 +6,8 +11+13,22 +13,23 +6,14,24 +8,20)

- Serururi monovalente de grup:

grup B (O:4,5)
grup D (O:9)
grup C (O:6,7,8)
grup E (O:9,12,26)
grup A (O:1,2)

- Ser monovalent Vi

- Seruri flagelare h

Aglutinarea cu unul din serurile polivalente de grup (aglutinare netă, ușor vizibilă cu ochiul liber, în 60 de secunde)denotă apartenența tulpinii la una din grupele majore cuprinse în ser; se continuă cu serurile monovalente de grup, grupele B și D fiind cele mai frecvente, se începe aglutinarea cu ele (aglutinare netă, ușor vizibilă cu ochiul liber, în 60 de secunde)

Dacă nu aglutinează cu nici unul dintre serurile polivalente, și caracterele exoenzimaticice sunt pentru *Salmonella* spp.,se încearcă aglutinarea cu Ser monovalent Vi dacă aglutinează în 30 de secunde, aglutinare netă, vizibilă cu ochiul liber, se poate afirma că tulpina poate fi *Salmonella typhi* sau paratyphi. Se termoinactivează tulpina, și se reiau aglutinările cu serurile polivalente, monovalente și seruri h (h::d, h:c, h:a, h:b)

Cu ajutorul serurilor polivalente si monovalente precum si a serurilor h (antigene H) se pot determina serotipurile genului *Salmonella* conform clasificarii Kauffman–White

Pentru *Shigella* spp. , sunt seruri:

Polivalent flexneri
Polivalent sonnei
Anti Boydi C1, C2, C3
Antidysenteriae 1-7
Antidysenteriae 8-12

Pentru *Yersinia enterocolitica*, sunt serul monovalent O3 și O9.

Pentru EPEC sunt :

Ser nonavalent
Ser trivalent 1 (Mixtură de 3 Serotipuri O111+O55+O26)
Ser trivalent 2 (Mixtură de 3 Serotipuri O86+O119+O127)
Ser trivalent 3 (Mixtură de 3 Serotipuri O125+O126+O128)
Ser trivalent 4 (Mixtură de 3 Serotipuri O114+O124+O142)

- Bacteriile patogene și înalt patogene izolate și identificate pe baza testelor biochimice și antigenice sunt testate pentru sensibilitatea și rezistența la antibiotice si stocate în eprubete cu mediu agarizat de transport, parafinate și expediate la Institutul „I. Cantacuzino”-București, pentru confirmarea identității și tipare bacteriană.

Pentru EHEC O:157H:7 identificarea antigenica se face prin latex aglutinare, kitul continand, martor pozitiv si martor negativ.

Pentru *Campylobacter* spp. enteropatogene kitul contine carduri dryspot, precum si martor pozitiv si negativ.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 25 din 31

COPROCULTURA ÎN TIA

Avand in vedere plurietiologia TIA, metodologia examenului microscopic se aplica si in aceste cazuri iar insamantarile semicantitative se executa pe toate mediile de cultura, inclusiv pe AS, pentru urmarirea stafilococilor, streptococilor si a speciilor de *Bacillus* in special *Bacillus cereus*. In paralel se executa coprocultura cantitativa, prin diluarea materiilor fecale in ser fiziologic, astfel incat sa obtinem o dilutie finala de 10^{-5} si 10^{-7} , prin insamantarea a 0,1 ml din dilutia 10^{-3} respectiv 10^{-5} , pe mediul ADCL si AS. Scopul acestei metode este de a determina specia bacteriana patogena sau conditionat patogena care se gaseste intr-o cantitate mare, peste limita acceptata, pentru continutul materiilor fecale.

NOTA:

Aceasta metodologie de insamantare cantitativa se aplica si in situatiile in care in care medicul clinician solicita coprocultura pentru bacterii conditionat patogene: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp*, *Serratia marcescens* (sindromul scutecului rosu)., sau se estimeaza proportia coloniilor dezvoltate si identificate din aceeasi specie bacteriana.

Schema dilutiilor pentru coprocultura cantitativa:

Nr. Epriubeta	1	2	3
Ser fiziologic	9 ml	10 ml +	10 ml +
Materii fecale	~ 1 mg (o ansa cu bucla mare)	0,1 ml	0,1 ml
	omogenizare	omogenizare	omogenizare
Dilutia	10^{-1}	10^{-3}	10^{-5}
Cantitate folosita pentru insamantare	-	0,1 ml	0,1 ml
Dilutia finala pe placa	-	10^{-5}	10^{-7}

Dupa 24 ore de incubare, se numara coloniile morfologic identice. Calcul: Nr. Colonii X dilutia. Daca numarul coloniilor dezvoltate este mai mare de 1×10^{-7} pentru bacterii conditionat patogene (din aceeasi specie bacteriana), atunci acestea pot fi considerate implicate in etiologia TIA.

Coprocultura in micoze intestinale

Se executa la indicatia medicului clinician sau in cazurile in care examenul microscopic depisteaza prezenta levurilor in cantitate mare si dominanta lor in comparatie cu flora bacteriana uneori diminuata pana la disparitie. Izolarea levurilor se face prin cultivare pe mediul Sabouraud .

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași	PROCEDURA SPECIFICA	Ediția 2
Laboratorul de analize medicale	COPROCULTURA	Revizia 0
	Cod: PSL – M2-02	Exemplar nr.
		Pag, 26 din 31

Pentru a incrimina etiologia micotica, intr-un sindrom diareic, este necesar a determina numarul de unitati formatoare de colonii/ gram sau ml materii fecale si identificarea levurilor respective.

Schema dilutiilor pentru coprocultura cantitativa: pentru levuri

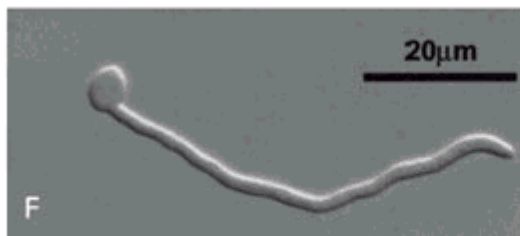
Nr. Eprubeta	1	2	3
Ser fiziologic	9 ml	10 ml +	10 ml +
Materii fecale	~ 1 mg (o ansa cu bucla mare)	1 ml	0,1 ml
	omogenizare	omogenizare	omogenizare
Dilutia	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Cantitate folosita pentru insamantare	-	0,1 ml	0,1 ml
Dilutia finala pe placa	-	10^{-3}	10^{-4}

In paralel cu insamantarea cantitativa din dilutiile 2 si 3 , se insamanteaza si din dilutia initiala, prin dispersie cu ansa, pe mediul Sabouraud. Se incubeaza la 25-37° timp de 2-3 zile. Se numara coloniile dezvoltate si se face calculul levurilor dupa formula: Nr. UFC X dilutia. Daca numarul coloniilor este mai mare de 10^9 , acestea pot fi implicate in diareea candidozica. *Candida albicans* , detine rolul major in etiologia micotica a sindromului diareic la imunodeprimati dupa antibioterapie de lunga durata, etc. Alte levuri se pot intalni in scaunul diareic, dar rolul lor in etiologia BDA este discutabila. Identificarea pentru *Candida albicans* se bazeaza pe testul de filamentare (testul tubului germinativ)



Candida albicans

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 27 din 31



Germ Tube (no constriction)



Pseudohyphae (constriction)

Diferenta fata de pseudohife



Testul filamentarii

- Se utilizează mediul Sabouraud cu sau fără inhibitori pentru bacteriile aerobe din materiile fecale;
- Însămânțarea MF este identică ca la coprocultura bacteriană, identificarea se realizează prin testul filamentării sau identificare pe galerii API , iar la solicitarea medicului curant se efectueaza antifungigrama.

10. COMUNICAREA REZULTATELOR SI VALORI DE REFERINTA

A.Examen citologic: Valoare de referinta : Absente/rare leucocite

“Rare leucocite ($\leq 2-5$ leucocite/ camp microscopic-obiectiv 40x)” in holera, viroze, etc.

“Reactie inflamatorie moderata (≥ 20 leucocite/camp microscopic-obiectiv 40x)” in salmoneloze, amoebioza, etc.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 28 din 31

„Reactie inflamatorie importanta (≥ 50 leucocite/camp microscopic-obiectiv 40x)”in shigeloze

Dupa caz, se precizeaza prezenta/absenta hematiilor.

B.Examen parazitologic: Valoare de referinta: Absente structuri parazitare

„ Prezent...” – se mentioneaza parazitul identificat

C.Examen micologic: Valoare de referinta: Absente/rare levuri

„ Prezente numeroase levuri/ pseudomicelii”

D. Examen digestie in Lugol: Absenti produsi anormali de digestie

E. Coprocultura: Valoare de referinta: Negativa (se precizeaza specia bacteriana cultivata)

„ Coprocultura pozitiva pentru....”.....(se precizeaza specia bacteriana cultivata si identificata)

F. Coprocultura cantitativa: Valoare de referinta: Negativa la dilutia 10^{-5} si 10^{-7}

„ Nr.colonii x dilutia ”.....(se precizeaza specia bacteriana cultivata si identificata)

OPERATIUNI FINALE

Izolarea si identificarea unei specii bacteriene patogene din materiile fecale este urmata de efectuarea antibiogramei conform PSL-M1-08-Antibiograma

Tulpinile se stocheaza in trei eprubete cu mediu de stocaj care se etanseizeaza cu parafina, si se noteaza pe eprubete specia bacteriana si numarul tulpinii. (doua astfel de stocaje se expediază Directiei de Sanatate Publica, respectiv Institutului „I. Cantacuzino”-Bucuresti)

Lamele de sticla se colecteaza in recipiente cu solutie clorinata 1%, eprubetele cu medii de cultura, utilizate se colecteaza in recipiente si vor fi sterilizate prin autoclavare, cele ramase intacte se spala, se sterilizeaza si se recicleaza.Placile Petri cu medii de cultura se colecteaza in cutii speciale cu capac si vor fi transportate la rampa de gunoi spre a fi incinerate.

11. PROCEDURI DE CONTROL DE CALITATE

Reactivii necesari, mediile de cultură, sunt controlate cu tulpini de referință existente la nivelul compartimentului.

Tulpini de referință: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610;

Aceste controale sunt introduse în lucru la fiecare lot de medii de cultură achiziționate sau ori de câte ori este nevoie.

Tulpinile izolate si identificate se expediază la Institutul „I. Cantacuzino” Bucuresti, pentru confirmarea identitatii bacteriene.

Periodic se executa insamantari paralele, din aceeasi proba biologica si comparari interpersonale (a doua opinie).

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 29 din 31

12. INTERPRETARE CLINICA DE LABORATOR

Izolarea Enterobacteriilor patogene: Shigella, Salmonella, Yersinia enterocolitica, Campylobacter (jejuni, coli, laridis si upsaliensis), E.coli enteropatogen si E. Coli enterohemoragic , din MF are intotdeauna semnificatie patologica (bolnav sau purtator sanatos). In cazul toxiiinfecțiilor alimentare, izolarea din MF, alimente, surse de apa potabila, etc. a aceleiasi specii bacteriene patogene sau a unui serovar identic, dar absenta la martori, iar in cazul bacteriilor conditionat patogene $>10^5$ UFC /gram materii fecale si aliment, denota implicarea in etiologia TIA.

13. SURSE POTENTIALE DE VARIATIE

A. Variatii biologice

- numarul mic de unitati infectante/g materii fecale ca si eliminarea sporadica la cazurile de portaj

B. Variatii prenatalitice

- prelevarea probelor biologice dupa instituirea antibioterapiei
- lipsa mediului de transport care mentine viabilitatea trofozoitilor, larvelor si bacteriilor
- stocarea probelor biologice recoltate in mediu de transport mai mult de 18-24 ore la temperatura camerei ceea ce permite dezvoltarea florei microbiene de asociatie
- etichetare gresita a probei sau inregistrare incorecta in Registrul de comenzi interne/ Registrul de analiza –rezultatul analizei se comunica pentru alt pacient.

C. Variatii analitice

- eroare de interpretare a caracterelor biochimice si antigenice al bacteriilor, corectabile prin comparari interpersonale si bilaterale intre laboratoare
- calitatea inadecvata a mediilor de cultura si reactivilor
- tehnica de lucru
- performantele individuale ale personalului implicat

D. Variatii postanalitice

- erori de transcriere a datelor si implicit in SIUI

14. REFERINTE

- DOCUMENTE DE REFERINȚĂ**
- 2.1. Manualul Calității Laboratorului, cod MCL-01,
 - 2.2. SR EN ISO: 15189: 2013 - Laboratoare medicale. Cerințe particulare pentru calitate și competență
 - 2.3. SR EN ISO/TR 22869 - Laboratoare medicale. Ghid pentru implementarea în laboratoare a ISO 15189 : 2003
 - 2.4. SR EN ISO 15190 : 2005 - Laboratoare medicale. Cerințe pentru securitate.
 - 2.5. IC-03 Controlul de calitate în microbiologie
 - 2.6. Ministerul Sănătății – Academia de Științe Medicale – Metode curente pentru analize de laborator clinic, Ed. medicală, București, 1982
 - 2.7. *Coprologie clinica*, Ed. Medicala, Bucuresti, 1974, I. Gherman
 - 2.8. D. Buiuc, M. Neguț, *Tratat de microbiologie medicală*, Editura Medicală, București, 1999
 - 2.9. *Microbiologie clinică* vol I, Ed. Didactică și Pedagogică, RA București 1998, D. Buiuc
 - 2.10. *Metode de laborator vol II*, Academia de științe medicale, Comisia de

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 30 din 31

Standardizare, Ed. Medicală, București 1997

2.11. Manualul de recoltare a produselor biologice, cod:PGL – 5.4-1;

2.12. *Parazitologie medicală*, Ed. ALL, București 1994, S.Rădulescu, A.Meyer

2.13. *Baze clinice pentru practica medicală vol IV*, Ed. Medicală, București

Prof.Dr.Doc. A.Păunescu-Podeanu

2.14. Metodologia anuală de supraveghere și control a bolii diareice acute (BDA) și holerei pentru sezonul iunie-noiembrie – Autoritatea de Sănătate Publică

2.15. D.Buiuc, M.Neguț, *Tratat de microbiologie medicală*, Editura Medicală, București, 2008

15. RESPONSABILITĂȚI

MANAGERUL TEHNIC:

- Verifică și aprobă prin semnătură și parafează buletinul de analiză, cod FGL- 5.8-01
- Oferă consultanță beneficiarului în legătură cu rezultatul analizei, dacă acesta solicită
- Execută analizele pentru care este responsabil și validează rezultatul acestora prin semnătură și parafă

RESPONSABILUL DE ANALIZĂ

- Verifică solicitarea medicului specialist de pe formularul de solicitare analize
- Verifică înregistrările asistentului de laborator ce deservește compartimentul 02, din registrul de lucru
- Examinează preparatele de microscopie optică și culturile bacteriene dezvoltate pe mediile de cultură, execută repicările, aglutinările pe lamă și latex aglutinările, interpretează caracterele exoenzimice dezvoltate de bacterii și a aglutinărilor pe lamă, respectiv a latexaglutinărilor, decide asupra testelor pe care le execută asistentul de laborator și formulează diagnosticul de laborator în registrul de lucru
- Întocmește și tipărește buletinul de analiză
- Verifică, semnează și parafează buletinul de analiză, cod FGL-5.8-01 și îl prezintă managerului tehnic spre aprobare

ASISTENTUL DE LABORATOR

- Preia coproculturile cu probe biologice concomitent cu formularele de solicitare analize de la registratorul medical din camera de receptură.
- Înregistrează probele biologice cu toate datele din formularele de solicitare analize, inclusiv ID-ul probelor în registrul de lucru.
- Transportă mediile de cultură și sticlăria pregătite pentru utilizare, în compartimentul de lucru și pregătește mediile de cultură pentru însămânțare.
- Efectuează însămânțarea produselor biologice pe medii de cultură, pregătește preparatele pentru microscopie optică, efectuează unele teste de laborator indicate de medic
- Transmite buletinul de analiză, registratorului medical respectiv asistentului medical de la cabinetul de recoltare

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICA COPROCULTURA Cod: PSL – M2-02	Editia 2 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag, 31 din 31

12.0 ÎNREGISTRĂRI ȘI ANEXE

- Registrul de comenzi interne/externe –pentru probele acceptate 4.4. - 01 I E
- Registrul de comenzi respinse- pentru probele necorespunzatoare RGL 4.4- 02
- Registrul de analize RGL – 4.4 – 01 I - MATERII FECALE
- Bulletin de analiza FGL- 5.8 - 01